

Sulo Kolehmainen

# *In situ* ELISA-menetelmän optimointi TrkB-reseptorin fosforylaation mittaamiseksi primäärihermosoluviljelmissä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

17.11.2014

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tekijä(t)<br>Otsikko<br><br>Sivumäärä<br>Aika                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Sulo Kolehmainen<br>In situ ELISA-menetelmä TrkB-reseptorin fosforylaation mittaamiseksi primäärihermosoluviljelmissä<br>36 sivua<br>10.11.14 |
| Tutkinto                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Laboratorioanalyttikko (AMK)                                                                                                                  |
| Koulutusohjelma                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Laboratorioalan koulutusohjelma                                                                                                               |
| Ohjaajat                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | FaT, akatemiattutkija Tomi Rantamäki<br>Lehtori Tiina Soininen                                                                                |
| <p>Aivoperäinen hermokasvutekijä (BDNF) ja sen tyrosiinikinaasireseptori TrkB säätelevät keskeisellä tavalla hermosolujen erilaistumista, selviytymistä ja muovautuvuutta. Niiden signalointiin liittyvät häiriöt onkin liitetty monien mielialahäiriöiden patofysiologisiin mekanismeihin ja reseptorin on arveltu olevan keskeinen tekijä masennuslääkkeiden terapeuttisten vaikutusten välittämisessä.</p> <p>Helsingin yliopiston Neurotieteen tutkimuskeskuksessa toteutetun opinnäytetyön tarkoituksena oli pystyttää <i>in situ</i> entsyymivälitteinen immunosorbentti-menetelmä (ELISA), jota voidaan hyödyntää TrkB-reseptorin fosforylaation mittaamiseksi primäärihermosoluviljelmistä. Kyseinen menetelmä on aikaisemmin pystytetty TrkB-reseptoria ilmentävälle fibroblastisolulinjalle, joka on joustavuudestaan huolimatta puutteellinen tutkimusväline keskushermostoon vaikuttavien lääkeaineiden seulottamiseksi, sillä fibroblastit eroavat perustavanlaatuisesti primäärihermosoluista. Primäärihermosolut ovat kasvualustansa suhteen vaativampia kuin fibroblastit, ja tavoitteena oli löytää viljelyolosuhteet, joissa olisi mahdollista mitata BDNF:n aikaansaama TrkB-fosforylaatio ja joissa primäärihermosolut olisivat morfologialtaan normaaliolosuhteissa viljeltyjen hermosolujen kaltaiset.</p> <p>Opinnäytetyön suorituksen aikana menetelmä saatiin toimimaan kohtalaisesti. Menetelmän signaali-kohina-suhdetta onnistuttiin terävöittämään pinnoittamiseen käytetyn poly-L-lysiinin konsentraatiota pienentämällä, pinnoitukselle herkkien vasta-aineiden vaihtamisella, sekä inkuboimalla primäärihermosoluja pidempiä aikoja, kuin pohjana käytetyn menetelmän fibroblasteja oli inkuboitu. Menetelmä on jo nykytilassaan hyödyllinen akateemisissa tutkimusprojekteissa ja menetelmän optimointi automatisoituun tutkimusympäristöön mahdollistaisi sen hyödyntämisen lääkeaineiden suurseulonnassa.</p> |                                                                                                                                               |
| Avainsanat                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Hermostot, välittäjäaineet, reseptorit, ELISA-testi                                                                                           |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Author(s)<br>Title                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Sulo Kolehmainen<br>Setting up an In Situ ELISA method for measurement of TrkB phosphorylation in primary neuron cultures |
| Number of Pages<br>Date                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 36 pages<br>7 Jul 2014                                                                                                    |
| Degree                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Bachelor of Laboratory Sciences                                                                                           |
| Degree Programme                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Laboratory Sciences                                                                                                       |
| Specialisation option                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Biosciences                                                                                                               |
| Instructors                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Tomi Rantamäki, PhD, Academy Research Fellow<br>Tiina Soininen, Principal Lecturer                                        |
| <p>Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its tyrosine kinase receptor TrkB regulate neuronal differentiation, survival and plasticity. Abnormal TrkB-BDNF signaling has been associated with the pathophysiological mechanisms of mood disorders. Emerging evidence suggests that TrkB and related interactions play a significant role in mediating the therapeutic effects of antidepressants.</p> <p>The thesis was carried out at the Neuroscience Center, University of Helsinki, and its purpose was to set up an in situ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for the measurement of TrkB phosphorylation in primary neuron cultures. The method has been previously set up for a fibroblast cell line expressing the TrkB receptor. Fibroblasts are a relatively flexible research tool but lack the structure and the functional characteristics of neurons. The main goal was to find culturing conditions in which the measuring of the BDNF-triggered TrkB phosphorylation would be possible and in which the cultured neurons would have the morphology of the neurons cultured in normal conditions.</p> <p>We managed to develop the method significantly during the project. Initially evidently low signal-to-noise ratio was optimized by altering the coating conditions, the antibodies used and the incubation periods. The method is ready for academic projects, but further optimization is required before it can be utilized in an automated high-throughput chemical screening.</p> |                                                                                                                           |
| Keywords                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Neuron, ELISA, Receptors, Primary Neuron Culture                                                                          |

## Sisällys

### Lyhenteet

|       |                                                 |    |
|-------|-------------------------------------------------|----|
| 1     | Johdanto                                        | 1  |
| 2     | Teoria                                          | 3  |
| 2.1   | Neurotrofiinit                                  | 3  |
| 2.2   | TrkB-reseptori                                  | 4  |
| 2.3   | TrkB-fosforylaation mittaaminen soluviljelmistä | 5  |
| 2.3.1 | Primäärihermosoluviljelmät                      | 8  |
| 2.3.2 | Primäärihermosoluviljelmien pinnoitteet         | 9  |
| 3     | Materiaalit                                     | 10 |
| 3.1   | Solumallit                                      | 10 |
| 3.2   | <i>In situ</i> ELISAn reagenssit                | 11 |
| 3.3   | Laitteet ja välineet                            | 12 |
| 4     | Työn suoritus                                   | 13 |
| 4.1   | pTrk-ELISA fibroblasteilla                      | 13 |
| 4.2   | Viabiliteetti eri pinnoitteilla                 | 16 |
| 4.3   | Poly-L-lysiinin vaikutus vasta-aineisiin        | 18 |
| 4.4   | Poly-L-lysiinin konsentraatio ja tilavuus       | 20 |
| 4.5   | Primäärisoluviljelmien iän vaikutus             | 21 |
| 5     | Tulokset                                        | 22 |
| 5.1   | Kuoppalevyvertailu                              | 22 |
| 5.2   | Viabiliteetti eri pinnoitteilla                 | 23 |
| 5.3   | Vasta-aineet                                    | 25 |
| 5.4   | Poly-L-lysiinin konsentraatio                   | 26 |
| 5.5   | Inkubaatioaika                                  | 27 |
| 5.6   | Optimoitu menetelmä                             | 28 |
| 6     | Yhteenveto                                      | 30 |
|       | Lähteet                                         | 32 |

## Lyhenteet

|                    |                                                                   |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------|
| ANOVA              | Analysis of Variance                                              |
| ATP                | Adenosine Triphosphate                                            |
| BDNF               | Brain-derived Neurotrophic Factor (aivoperäinen hermokasvutekijä) |
| BSA                | Bovine Serum Albumin                                              |
| cDNA               | Complementary Deoxyribonucleic acid                               |
| DIV                | Days in Vitro                                                     |
| ECL                | Enhanced Chemiluminescence                                        |
| ELISA              | Enzyme-linked Immunosorbent Assay                                 |
| FCS                | Fetal Calf Serum                                                  |
| HRP                | Horseradish Peroxidase                                            |
| kDa                | Kilodalton                                                        |
| NB                 | Neurobasal                                                        |
| NB+                | Neurobasal with additives                                         |
| NGF                | Nerve Growth Factor (hermokasvutekijä)                            |
| NT-3               | Neurotrophin-3                                                    |
| NT-4               | Neurotrophin-4                                                    |
| p75 <sup>NTR</sup> | p75 Neurotrophin Receptor                                         |
| PBS-T              | Phosphate Buffered Saline with Tween-20                           |
| PLL                | Poly-L-Lysine                                                     |
| pTrk               | Phosphorylated Trk-receptor                                       |
| RPM                | Revolutions per Minute                                            |
| RT                 | Room Temperature                                                  |
| TrkB               | Tropomyosin-related kinase B (tropomysiinin kaltainen kinaasi B)  |

## 1 Johdanto

Ensimmäiset masennuslääkkeet löydettiin yli 65 vuotta sitten. Iproniatsidi ja Imipramiini olivat kemialliselta rakenteeltaan melko erilaisia, mutta pääasiallisena kohteena molemmilla lääkeaineilla oli joko monoamiinien katabolismin tai takaisinoton estäminen. Nämä löydökset johtivat käsitykseen, että masennus johtuu monoamiinien kemiallisesta epätasapainosta aivoissa ja että masennusta voidaan hoitaa täsmällisesti tätä epätasapainoa korjaamalla. Silloiset tutkimukset pyrkivät löytämään jonkinlaisia pitkäaikaisia muutoksia monoaminergiseen signaalointiin vaikuttavien proteiinien ilmentämisessä ja interaktioissa, mutta mitään ratkaisevia löydöksiä ei tehty. [1.] On mielenkiintoista, että masennuslääkkeiden vaikutukset todetaan yleensä vasta 2 - 3 viikon kuluttua hoidon aloittamisesta. Tämä on johtanut hypoteesiin, jossa masennuslääkkeiden ajatellaan lisäävän hermoverkkojen muovautuvuutta TrkB-reseptorin välityksellä [2].

TrkB-reseptorit ovat tyrosiinikinaasien ryhmään kuuluvia proteiineja, jotka toimivat reseptoreina neurotrofiineiksi kutsutuille hermokasvutekijöille. Näiden reseptorien ja neurotrofiinien interaktion on todettu edistävän esimerkiksi aivojen kykyä muovautua. Tämä on keskeistä sikiön kehityksessä, kytköksissä oppimiseen, ja sen arveltu olevan tärkeässä asemassa myös masennuksesta toipumisessa.

Neurotrofiiniin liittyessä reseptoriin kyseinen reseptori fosforyloituu viedäkseen signaalia eteenpäin. Tämä fosforylaatio on mitattavissa vasta-aineisiin pohjautuvilla biokemiallisilla menetelmillä, kuten entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä, ELISAlla. Mittaus voidaan suorittaa aivokudosnäytteistä, mutta eläintöistä aiheutuvien nousevien kustannusten ja vaivalloisuuden vuoksi esimerkiksi lääkeaineseulonnoissa käytetään yhä useammin primäärihermosoluja tai muita soluviljelmiä.

TrkB-reseptorin fosforylaation mittaamiseen on hiljattain kehitetty suhteellisen vaivaton *In situ* ELISA-menetelmä, jossa solut kasvatetaan, stimuloidaan ja lypsataan ELISA-levyllä. Kyseinen menetelmä on optimoitu reseptoria ilmentävälle solulinjalle, joka eroaa morfologialtaan ja aineenvaihdunnaltaan olennaisesti primäärihermosoluista. Menetelmää on yritetty siirtää primäärihermosoluilla

käytettäväksi, mutta tähän mennessä parhaaseen tulokseen on päästy menetelmällä, jossa hermosolut kasvatetaan erillisellä maljalla ELISA-levyn sijaan. Tästä johtuen protokollan suorittaminen sisältää runsaasti työllistäviä manuaalisia pipetointivaiheita, jotka estävät menetelmän automatisoinnin esimerkiksi kattavaa lääkeaineseulontaa varten.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli löytää materiaalit ja olosuhteet, joissa primäärihermosolut kiinnittyvät ELISA-levylle, sekä joissa ne ovat morfologialtaan ja viabiliteetiltään samankaltaisia kuin normaaliviljelyolosuhteissa. Lisäksi näissä olosuhteissa tulisi olla mahdollista mitata herkästi aivoperäisen hermokasvutekijän (BDNF) aikaansaama TrkB-reseptorin fosforylaatio, jota voidaan käyttää vertailukohteena TrkB-signalointiin vaikuttavia lääkkeitä etsittäessä.

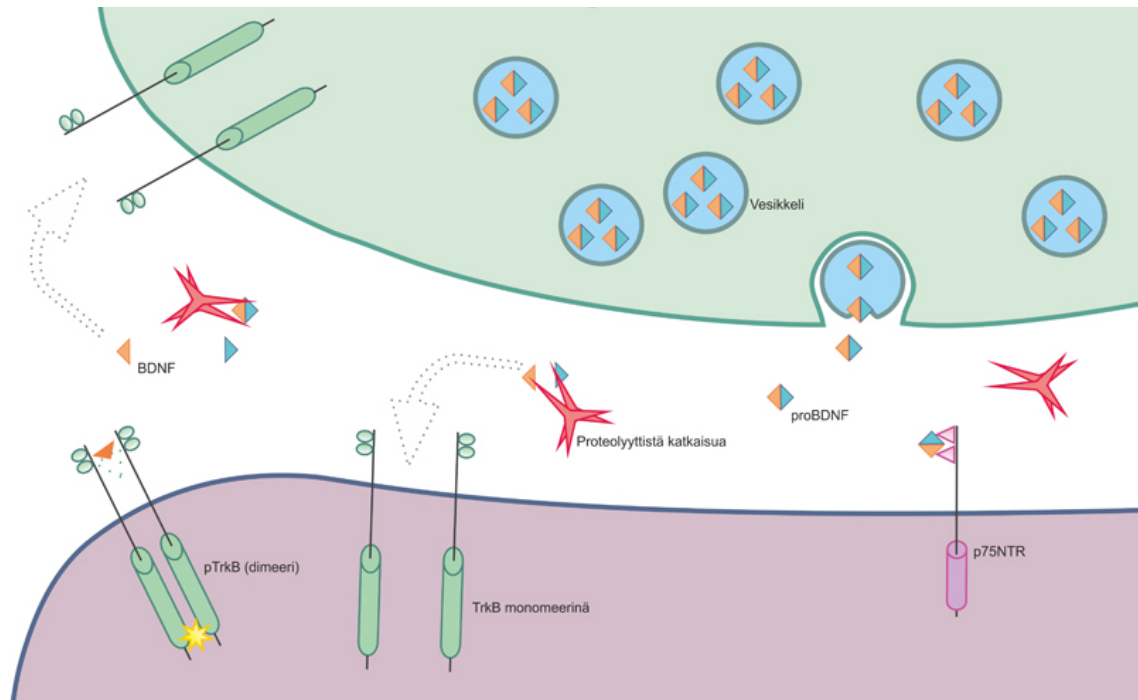
## 2 Teoria

### 2.1 Neurotrofiinit

Neurotrofiinit ovat suhteellisen pienikokoisia hermokasvutekijöihin kuuluvia proteiineja, jotka useiden muiden proteiinien tapaan syntetisoidaan karkealla endoplasmisella kalvostolla. Neurotrofiinit osallistuvat keskeisesti hermosolujen kehityksen, erilaistumisen, suojaamisen ja muovautuvuuden säätelyyn. Erityisen tärkeitä ne ovat sikiön aivojen kehityksessä. Neurotrofiineja tunnetaan neljää tyyppiä; NGF, BDNF, NT-3, sekä NT-4. Ne sitoutuvat kukin suurella affiniteetilla tiettyyn Trk-reseptoriin, poikkeuksena NT-4, joka sitoutuu samaan reseptoriin kuin BDNF, mutta pienemmällä affiniteetilla. BDNF on eniten aivoissa esiintyvä neurotrofiini ja se on liitetty monien masennuslääkkeiden toimintaan [3]. Tämän vuoksi aivoihin ja keskushermostoon vaikuttaviin lääkeneisiin liittyvä tutkimus keskittyy yleisesti siihen, sekä sen keskeisimpään reseptoriin TrkB:hen. [4.]

BDNF:n synteesi on proteiinisynteesille tyypilliseen tapaan hyvin tarkoin säädeltyä. Sitä koodaava geeni sisältää yksitoista 5' eksonia ja yhden 3' eksonin [5]. Synteesi kulkee proBDNF:ksi kutsutun esiasteen kautta valmiiksi, hermosolujen säilymistä ja hermoyhteyksien muovautuvuutta edistäväksi, vain 27 kDa:n kokoiseksi proteiiniksi. Sen monimutkainen matka aminohappoketjusta valmiiksi toiminnalliseksi proteiiniksi sisältää monta säätelykohtaa ja vaihtoehtoista reittiä, joiden avulla sen lopullinen funktio määritetään. BDNF pakataan synteessin alkuvaiheiden jälkeen vesikkeliin dimeerisessä epäkypsässä muodossa. Vesikkelin sisällä tätä niin sanottua proBDNF:ää muokataan entsyymaattisesti ja vesikkeli kuljetetaan aksonia pitkin synapsiin. BDNF ja sen esiaste vapautuvat synapsista solun ulkopuolelle, jossa pro-osa pilkkotaan joissain tapauksissa irti, joko plasmiinin tai matriksin proteinaasien toimesta. Kypsä BDNF sitoutuu korkealla affiniteetilla TrkB-reseptoriin (kuva 1), mikä aktivoi solunsisäistä signalointia ja johtaa reaktiosarjaan, joka edistää muun muassa solun henkiinjäämistä ja hermoyhteyksien vahvistumiseen vaikuttavien geenien ilmentymistä. Pro-osan jäädessä pilkkoutumatta, proBDNF sitoutuu mitä todennäköisimmin tuumorinekroositekijöiden perheeseen kuuluvaan p75-reseptoriin. [6.]





**Kuva 1: BDNF vapautuu synaptisista vesikkeleistä solun ulkopuolelle, minkä jälkeen sen epäkypsä proBDNF pilkkotaan irti plasmiinin ja matriksin proteinaasien toimesta. Kypsä osa sitoutuu korkealla affiniteetilla TrkB-reseptoriin, joka muodostaa dimeerin ja aktivoituu. Epäkypsän osan jäädessä pilkkoutumatta proBDNF sitoutuu korkealla affiniteetillä p75-reseptoriin.**

Vaikka useat tutkimukset ovat osoittaneet joidenkin lääkeaineiden lisäävän BDNF-geenin ilmentymistä, se ei välttämättä merkitse lisääntyntä TrkB-signaalointia. Ensinnäkään kasvu BDNF:n määrässä ei välttämättä tarkoita, että sitä vapautuu suurempia määriä. Lisäksi erityisesti proBDNF-muodossa vapautunut BDNF aktivoi TrkB-reseptorin sijaan p75-reseptoria, jonka toiminta on vielä osittain tuntematon. Joissain yhteyksissä sen aktivaatio näyttäisi kuitenkin johtavan miltei päinvastaisiin lopputuloksiin kuin TrkB-reseptorin aktivaatio, esimerkiksi apoptoosiin [7].

## 2.2 TrkB-reseptori

TrkB kuuluu tropomyosiinin-kaltaisten tyrosiinikinaasireseptorien perheeseen. Ne ovat reseptorimuotoisia tyrosiinikinaaseja, jotka sijaitsevat useiden lihas-, munuais-, ja hermosolujen solukalvolla. Reseptori voidaan periaatteessa jakaa kahteen osaan: Solun ulkopuolella sijaitsevaan ekstrasellulaariseen osaan, joka toimii interaktioissa neurotrofiinien kanssa ja intrasellulaariseen osaan, joka toimii katalysoivana entsyyminä solun sisällä.

TrkB-reseptorin solun ulkopuolinen osa on runsaasti N-glykosyloitu ja jopa 33 % sen molekyylipainosta koostuu sokereista [8]. Reseptorin molekyylipaino voikin vaihdella kohtuullisen paljon glykosylaation määrästä riippuen. Glykosylaation kaksi keskeisintä funktiota ovat estää reseptorin autofosforylaatio ilman ligandia ja säädellä reseptorin synteesinjälkeistä kuljetusta solukalvolle [7]. Solun ulkopuolinen osa sisältää kaksi immunoglobuliini-C2 domainia, jotka ovat keskeisessä asemassa ligandin tunnistamisessa ja sen välisessä interaktiossa reseptorin kanssa [10]. Reseptorin solun sisäinen osa koostuu tyrosiinikinaasista, jonka tehtävänä on siirtää fosfaattiryhmä adenosiinitrifosfaatilta (myöh. *ATP*) tyrosiinille. [11.]

Kun ligandi sitoutuu Trk-reseptoriin, reseptori muodostaa kahtaismuodon eli dimeerin ja aktivoituu. Dimerisaatio saa aikaan solunsisäisen osan tyrosiinijäämien transfosforylaation. Fosforyloituneet tyrosiinijäänteet toimivat sitoutumispaikkoina solunsisäisille, reseptorin signaalia eteenpäin vieville proteiineille. Reseptorin aktivoituminen johtaa potentiaalisesti useaan reaktiokaskaadiin. Esimerkkeinä niistä ovat AKT-reitti, joka edistää solun henkiinjäämistä, ERK-reitti, joka vaikuttaa solun erilaistumiseen, sekä PLC- $\gamma$ , jonka on todettu edistävän hermoverkkojen muovautuvuutta esimerkiksi aksonien kasvulla. [4.; 6.]

Ei ole sattumaa, että laajamittaisen tutkimuksen kohteena ovat juuri nämä reseptorit ja niiden ligandit. BDNF:stä aiheutuva TrkB-signaali on liitetty antidepressanttien terapeuttisiin vaikutuksiin ja sen normaalista poikkeavan signaalin on arveltu liittyvän keskeisesti myös joidenkin mielialahäiriöiden patofysiologisiin mekanismeihin. Joidenkin lääkeaineiden on todettu aktivoivan TrkB-reseptorin signaalia [12], siitä aiheutuva lisääntynyt aktiivisuus voi käynnistää hitaan, ympäristön ohjaaman hermoyhteyksien uudelleenjärjestäytymisprosessin. Tämä saattaa selittää, miksi masennuslääkkeiden vaikutukset mielialaan ilmenevät vasta viikkojen viiveellä. Seulontamenetelmät, joiden avulla voidaan etsiä TrkB-reseptorin aktiivisuuteen vaikuttavia lääkeaineita, ovatkin erittäin mielenkiintoisia uudenlaisten antidepressanttien ja aivojen muovautuvuutta edistävien lääkkeiden etsinnässä. [13.]

### 2.3 TrkB-fosforylaation mittaaminen soluviljelmistä

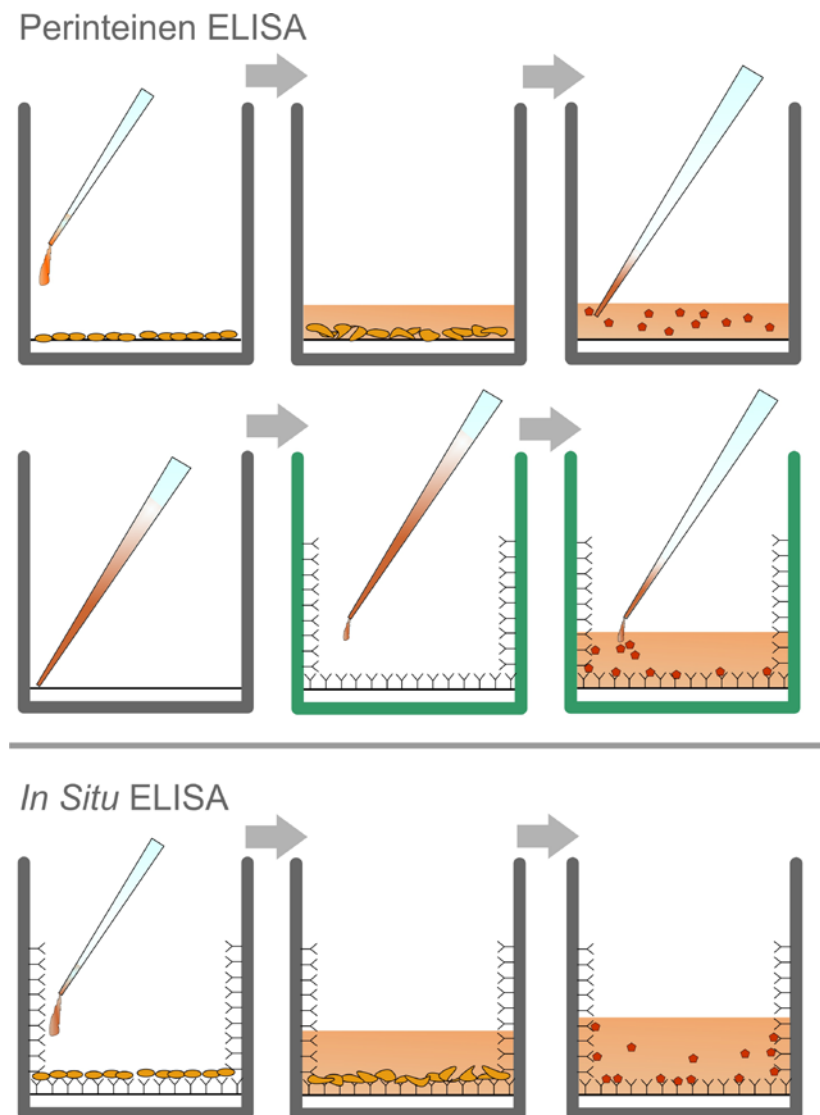
ELISA on kuoppalevyihin pohjautuva analyysimenetelmä, joka hyödyntää tutkittavalle analyytillä spesifejä vasta-aineita ja mahdollistaa useiden näytteiden samanaikaisen analysoinnin. Menetelmä on kehittynyt runsain mitoin sen keksimisestä. 70-luvun

alkupuolella oli tavanomaista, että immunosorbentit materiaalit olivat selluloosapohjaisia, ja tämän vuoksi työvaiheet sisälsivät analyysiaikaa pitkittäviä sentrifugointeja. Materiaali vaihdettiin melko nopeasti polystyreeniksi. [14.] Tämän seurauksena syntyi menetelmä, joka oli suhteellisen halpa ja suoritettavissa myös laboratorioissa, jotka eivät tekniseltä varustelultaan olleet huippuluokkaa [15].

Tyypillisin nykyään käytetty ELISA lienee ns. "Sandwich-ELISA", jossa tutkittava proteiini sitoutuu kuoppalevyn kaivojen sisäpintaan kiinnitettyyn primäärivasta-aineeseen ja se tunnistetaan tämän jälkeen entsyymikonjugoidulla sekundäärivasta-aineella. Entsyymikonjugoitu sekundäärivasta-aine tunnistetaan levyllä substraatin avulla. Substraatti valitaan siten, että entsyymin muokatessa sitä syntyy joko värireaktio tai mitattavissa oleva kemiluminesenssi. Yleisesti käytetty entsyymi on piparjuuriperoksidaasi (myöh. HRP). Sen yhteydessä substraattina voidaan käyttää reagenssia, joka sisältää luminolia. HRP katalysoi luminolin hapettumisen välivaiheiden kautta 3-aminoftalaatiksi. Tämä reaktio vapauttaa fotoneita, jotka on mahdollista kvantitoida herkästi, mikäli käytössä on riittävän laadukas detektori. Sandwich-ELISA:n etuihin lukeutuvat kahdesta vasta-aineesta johtuva korkea spesifisyys, useasta mahdollisesta tunnistusmenetelmästä johtuva joustavuus ja se, ettei näytettä useissa tapauksissa tarvitse juurikaan esikäsitellä. [16.] ELISA-menetelmät sisältävät kuitenkin usein vaiheita, jotka vaativat keskittymistä ja käsin työskentelyä. Joissain tapauksissa näytteet pitää pipetoida kuoppalevylle yksitellen. Tämä on työlästä ja nostaa lisäksi varianssia näytteiden välillä, kun inhimilliset virhelähteet otetaan huomioon. Monet ELISA-menetelmät ovatkin menossa kohti automaatiota, missä manuaalisten työvaiheiden sijaan robotti hoitaa pipetoinnit ja pesut. Tämä on erityisen hyödyllistä, kun tutkittavia näytteitä on satoja, esimerkiksi lääkkeitä seulottaessa.

TrkB-reseptorin fosforylaation mittaamiseen on kehitetty ELISA-menetelmä, jossa soluja stimuloidaan BDNF:llä tai mielenkiinnon kohteena olevalla lääkkeitä. Tämän jälkeen solut lysataan ja lysaatti siirretään ELISA-levylle, jolla Trk-reseptorit sitoutuvat niille spesifiin vasta-aineeseen. Tämän jälkeen fosforyloituneet Trk-reseptorit tunnistetaan toisella vasta-aineella. Menetelmää on hyödynnetty myös *In situ* -kontekstissa, jossa solut kasvatetaan primäärivasta-aineen kanssa samalla kuoppalevyllä. Tässä yhteydessä lysaatteja ei tarvitse siirtää manuaalisesti kuoppalevyltä toiselle. Tämä säästää aikaa ja työvoimaa, sekä mahdollistaa menetelmän lähes täydellisen automaation (kuva 2). Menetelmän *In situ* -versio on

saatu toimimaan vain solulinjoilla, kuten TrkB-reseptoria ekspressoivilla fibroblasteilla, eikä sen soveltuvuudesta primärihermosoluille ole tietoa. [17.]



Kuva 2: Perinteisessä menetelmässä (ylempi) solut lyysataan kasvatuslevyllä minkä jälkeen lysaatit siirretään kaivo kerrallaan ELISA-levylle, joka on pinnoitettu primäärivasta-aineella. *In situ* -menetelmässä solut kasvatetaan samalla levyllä primäärivasta-aineen kanssa, eikä lysisauksenjälkeistä siirtoa näin ollen tarvita.

Vaikka solulinjat ovat primärihermosoluja joustavampi työkalu esimerkiksi ELISA-menetelmän TrkB-fosforylaation tunnistuskyvyn herkkyyden optimointiin, niin erityisesti reseptorin fosforylaatiota aktivoivien, keskushermostoon vaikuttavien lääkeaineiden seulonnassa ne ovat valitettavan puutteellinen tutkimusväline. Primärihermosolut eroavat immortalisoiduista fibroblasteista perustavanlaatuisesti morfologialtaan ja aineenvaihdunnaltaan. Fibroblasteilla ei ole rakenteita, jotka vastaisivat aksoneita, dendrittejä tai synapseja. Lisäksi niiden rajaton jakaantumispotentiaali tekee niistä syöväntapaisesti jakaantuvia, kun taas neuronit

eivät erilaistuttuaan jakaannu lainkaan. Samasta syystä johtuen fibroblastit ovat viljelmissä käytännössä aina samanlaisia, mutta primäärineuronit maturoituvat ja niiden Trk-signaloinnin aktiivisuus muuttuu sen mukana [18.; 19.] Lisäksi keinotekoisesti TrkB:tä ilmentävät fibroblastit eivät reseptorin lisäksi välttämättä ilmennä mitään muita siihen liittyvän signaloinnin kannalta oleellisia proteiineja. Primäärihermosolut ovat tutkimusmallina kaukana kokonaisista toiminnallisista aivoista, mutta paljon lähempänä kuin yhtä mielenkiinnon kohteena olevaa reseptoria ilmentävä solulinja.

### 2.3.1 Primäärihermosoluviljelmät

Primäärihermosolut ovat huomattavasti vaativampia kasvualustansa suhteen kuin solulinjat. Siinä missä esimerkiksi fibroblastit kasvavat suoraan tehdaspinnoitetulla maljalla, neuronit tarvitsevat lisäpinnoituksen pystyäkseen kiinnittymään maljan pintaan. Tehdaspinnoite saadaan aikaan altistamalla positiivisesti varautunut polystyreenipinta hapettaville olosuhteille. Sitoutunut happi muuttaa pinnan varauksen negatiivisemmaksi kasvatusmedian läsnä ollessa. Tämä vähentää maljan hydrofobisuutta ja sallii solujen kiinnittymistä edistävien proteiinien vitronektiinin ja fibronektiinin kiinnittyä pintaan helpommin. [20.]

Ongelmia tehdaspinnoituksen kanssa tulee siinä vaiheessa, kun halutaan käyttää kasvatusmediaa, joka ei sisällä seerumia. Tämä johtuu siitä, että edellä mainitut kiinnittymistekijät ovat nimenomaan seerumissa. [21.] Primäärihermosoluja viljellessä käytetään yleisesti seerumi-vapaata kasvatusmediaa. Tällä ravinneköyhällä medialla yritetään estää muiden aivoissa tyypillisesti esiintyvien solujen kasvu. [22.] Suurin ongelma ovat glia-solut, jotka ovat aivoissa esiintyviä tukisoluja. Niiden normaaleihin tehtäviin kuuluu esimerkiksi solun ulkopuolisen tilan kemiallisen tasapainon säätely ja myeliinitupen muodostaminen aksonien ympärille. Ongelmalliseksi ne tekee se, että ne ovat jakautuvia soluja, mitä neuronit eivät ole. Tämä johtaa pahimmassa tapauksessa siihen, että gliasolut valtaavat maljalta kaiken tilan ja siten myös ravinteet, eikä neuronien tutkiminen näin ollen ole mahdollista. [23.] Primäärihermosoluja preparoidessa solut maljataankin aluksi petrimaljalle, jolle glia-solut kykenevät kiinnittymään, mutta neuronit eivät. Malja jätetään puoleksi tunniksi inkubaattoriin ja sen jälkeen kerätään sillä oleva kasvatusmedia talteen. Suurin osa glia-soluista on tarttunut maljan pohjaan, mutta neuronit ovat vielä mediassa. Glia-solujen määrä on valmiissa viljelmässä tämän vuoksi huomattavasti pienempi, mutta

niitä on aina läsnä. Seerumin lisääminen kasvatusmediaan saakin ne jakaantumaan räjähdysmäisesti. Tästä johtuen puhdas neuroniviljelmä vaatii seerumi-vapaan median, ja sen seurauksena tarvitaan jokin solujen kiinnittymistä edistävä pinnoite.

### 2.3.2 Primäärihermosoluviljelmien pinnoitteet

Yleisesti ottaen primäärihermosoluviljelmiin käytettävät maljat ja kuoppalevyt pinnoitetaan poly-L-lysiinillä. Muita vaihtoehtoisia kiinnittymistekijöitä ovat muun muassa fibronektiini ja laminiini. PLL on luonnollinen homopolymeeri, joka otettiin alun perin käyttöön yksinomaan lasipinnoille, sillä lasin ajateltiin olevan huono kasvualusta sen negatiivisen varauksen vuoksi. Tämä johtui siitä, että nettovaraus neuronien pinnoilla on tavallisesti myös negatiivinen. PLL:n ajateltiin edistävän solujen kiinnittymistä pintavarausta muuttamalla. Todellisuudessa asia ei ole näin yksinkertainen. Todennäköisesti PLL edistää ekstrasellulaarisella matriksilla olevien kiinnittymistä edesauttavien proteiinien ja lektiinien adsorptiota. [20.]

Laminiinit ovat luonnollisesti ekstrasellulaarisen matriksin tyvikalvolla esiintyviä proteiineja. Hermosolujen aksonit sisältävät pintarakenteita, joita kutsutaan integriineiksi. Ne ovat tarttumisreseptoreja, joista osa sitoutuu nimenomaan laminiiniin. Tämä interaktio edistää aksonien kasvua ja solujen kiinnittymistä alustaan. [24.]

### 3 Materiaalit

#### 3.1 Solumallit

MG87TrkB on NIH/3T3-soluihin pohjautuva solulinja. 3T3-solut ovat hiiren alkiosta peräisin olevia fibroblasteja, jotka ovat läpikäyneet spontaanin mutaation ja sitä kautta saavuttaneet rajattoman jakaantumispotentiaalin. MG87TrkB-solut on transfektoitu plasmidilla, joka sisältää rotan Ntrk2-geenin cDNA-sekvenssin TrkB-reseptorin yliekspressoimiseksi. Lisäksi plasmidi sisältää geenin, jonka DNA-sekvenssi pohjautuu Aph-I-geeniin. Geeni koodaa aminoglykosidi 3'-fosfotransferaasi-entsyymiä. [25.] Tämä entsyymi deaktivoi nisäkässoluissa G418-antibioottia, joka kuuluu aminoglykosideihin. Ilman tätä entsyymiä solut kuolevat G418:aa sisältävälle maljalle, sillä se estää niiden polypeptidisynteesin. Sitä käytetään, koska se auttaa välttämään kontaminaatioita estämällä monien bakteerien ja muiden nisäkässolujen kasvun maljalla [26.]. Solujen irrottamiseen käytettiin Trypsin-EDTA:ta ja ne kasvatettiin DMEM:issä (taulukko 1). Solujen stimulointiin käytettiin Peprrotechin tuottamaa BDNF-liuosta.

Taulukko 1: MG87TrkB-solujen kasvatusliuoksen koostumus

| <b>Kasvatusmedia</b>                                               |
|--------------------------------------------------------------------|
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®, Life Technologies) |
| G418/Geneticin 400 µg/ml (CB)                                      |
| 10 % Fetal Bovine Serum (Gibco®, Life Technologies)                |
| 1 % Penicillin Streptomycin (Gibco®, Life Technologies)            |
| 1 % L-Glutamine (Gibco®, Life Technologies)                        |

## Primäärihermosolut

Menetelmän optimoinnissa käytetyt primäärihermosolut preparoitiin rotan embryoista, jotka olivat 17 - 18 vrk:n ikäisiä. Preparoinnissa käytettiin preparointimediaa ja DMEM-kasvatusliuosta. Preparoinnin suoritti laboratorioteknikko Outi Nikkilä. Solut viljeltiin neurobasal kasvatusmediassa (taulukko 2), joko poly-L-lysiini (Sigma) tai laminiinipinnoitetta (Invitrogen) käyttäen. Stimulointiin käytettiin Peprrotechin tuottamaa BDNF-liuosta.

Taulukko 2: Primäärihermosolujen yhteydessä käytetyt liuokset

| Preparointimedia (HBSS)                              | DMEM                                      | Neurobasal                             |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|
| Hank's Balanced Salt Solution w/o Ca and Mg (Gibco®) | Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco®) | Neurobasal® Medium (Gibco®)            |
| 1 mM Natriumpyruvate (Sigma)                         | 10 % Fetal Calf Serum (Gibco®)            | 2% B27 Supplement, Serum Free (Gibco®) |
| 10 mM HEPES pH 7,2 (Gibco®)                          | 1 % Penicillin Streptomycin (Gibco®)      | 1% Penicillin Streptomycin (Gibco®)    |
|                                                      | 1 % L-Glutamine (Gibco®)                  | 1% L-Glutamine (Gibco®)                |

### 3.2 *In situ* ELISAn reagenssit

Primäärivasta-aine laimennettiin kaikissa tapauksissa OptaCOAT<sup>tm</sup>-puskuriin (ALerCHEK Inc.). Sekundäärivasta-aineet laimennettiin blokkauksliuokseen tai pesupuskuriin (taulukot 3 ja 4).

Taulukko 3: Käytetyt vasta-aineet

| Primääri                                                              | Sekundääri                                                   | Tertiääri                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| SC-11, Trk-antibody (Rabbit polyclonal igG, Santa Cruz Biotechnology) | PY-20 Biotin, (Anti phosphotyrosine:biotin Mouse, BioRad)    | Streptavidin, HRP Conjugated (ImmunoPure®, Thermo Scientific) |
|                                                                       | PY-20 (Anti phosphotyrosine Mouse, BioRad)                   | Goat Anti-Mouse HRP Conjugated (BioRad)                       |
|                                                                       | PY-20 HRP (Anti phosphotyrosine HRP Conjugate Mouse, BioRad) |                                                               |
|                                                                       | 4G10 (Anti-phosphotyrosine Clone, mAb, Mouse, Millipore)     |                                                               |



Taulukko 4: Puskuriliuokset

| Blokkausliuos                                                           | Lyysispuskuri                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 2 % Bovine Serum Albumin, Lyophilized powder $\geq$ 96% (Sigma-Aldrich) | ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit (Fermentas)                |
| 0,1 % Tween® 20, Proteomics Grade (Amresco)                             | 2 mM Sodium Orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Sigma-Aldrich) |
| Phosphate Buffered Saline 10x 1:10 in MilliQ-water                      | Complete Protease Inhibitor Mix (Roche)                               |

### 3.3 Laitteet ja välineet

Kuoppalevyinä ELISAA varten käytettiin joko Perkin-Elmer Optiplate- tai Isoplate-levyjä. Soluja erikseen kasvattaessa käytettiin Perkin-Elmer Cultureplate-levyä. Levyjen pesut suoritettiin Thermo Scientific Well Wash AC -kuoppalevypesurilla. HRP tunnistettiin levyiltä Pierce® ECL Western Blotting Substraattia (Thermo Scientific) käyttäen. Levyjen luminesenssi luettiin Thermo Scientific Varioskan Flash kuoppalevylukijalla.

## 4 Työn suoritus

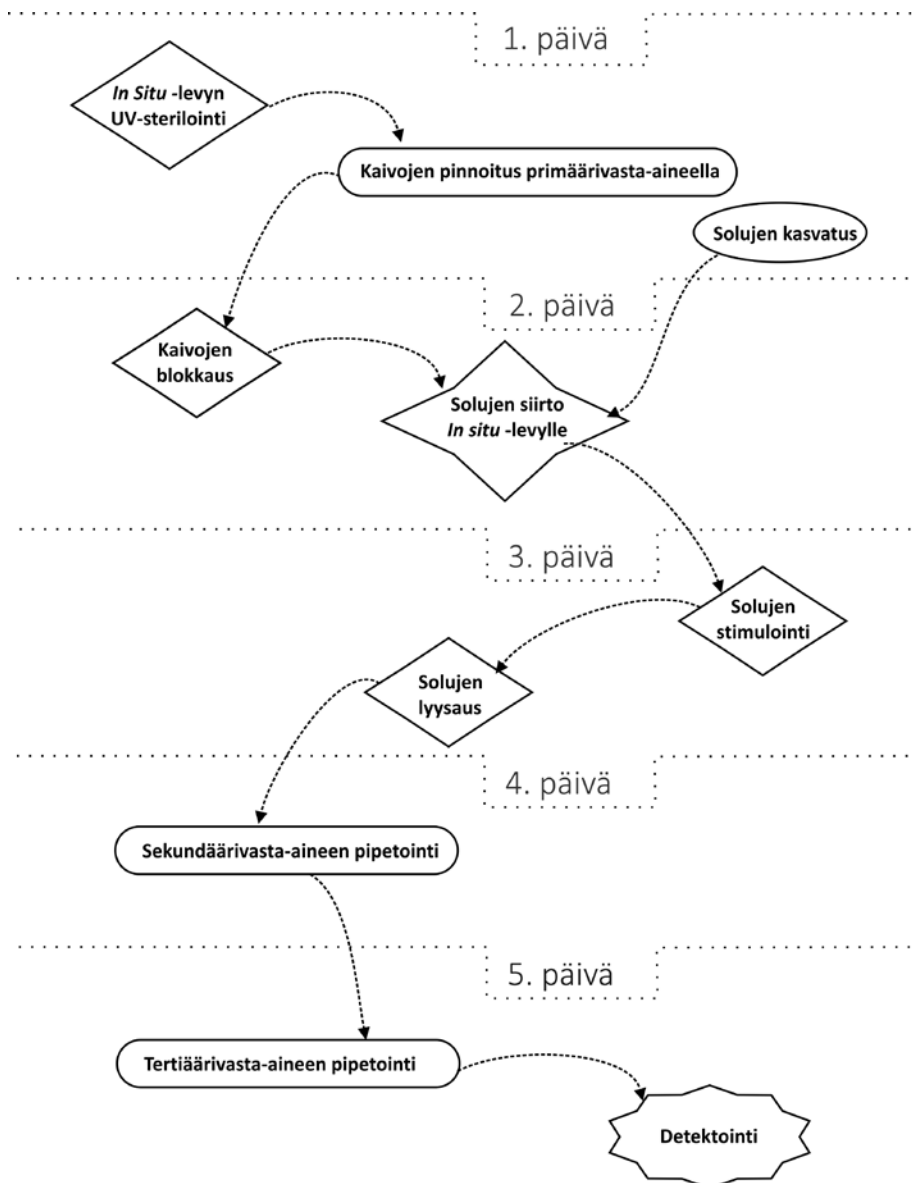
Menetelmän optimoinnin aikana muutettiin useita parametreja. Yhteenveto muokatuista parametreista ja kokeilluista vaihtoehdoista on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5: Menetelmän optimoinnin aikana muutetut parametrit

| Kuoppalevy | Pinnoite                            | Sekundääri vasta-aine | Pinnoitekonsentraatio | Inkubaatioaika |
|------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|
| Optiplate  | Laminin 6,67 µg/ml Opt.             | PY-20                 | 0,001%                | 1 DIV          |
| Isoplate   | Laminin 20 µg/ml Opt.               | PY-20 biot.           | 0,0001%               | 2 DIV          |
|            | Laminin 6,67 µg/ml H <sub>2</sub> O | PY-20 HRP             | 0,00002%              | 3 DIV          |
|            | Laminin 20 µg/ml H <sub>2</sub> O   | 4G10                  |                       | 6 DIV          |
|            | Poly-L-lysiini                      |                       |                       | 14 DIV         |
|            | Optacoat                            |                       |                       |                |

### 4.1 pTrk-ELISA fibroblasteilla

Optimoitavan menetelmän lähtökohtana käytettiin TrkB-reseptoria ekspressoiville fibroblasteille optimoitua *In situ* ELISA-menetelmää (kuva 3). Menetelmässä on aiemmin käytetty kahta erilaista kuoppalevyä: Perkin-Elmer Optiplate ja Isoplate. Niiden ainoa ero on pohjan läpinäkyvyys. Isoplaten läpinäkyvä pohja mahdollistaa solujen tarkkailun mikroskoopilla, mikä on hyödyllistä solujen morfologian ja konfluenssin seuraamisessa pitkien inkubaatioaikojen yhteydessä. Läpinäkyvän levyn pohjaan voidaan liimata valkoinen tarra, joka mahdollistaa kemiluminesenssin mittaamisen, mutta oletettavasti matalammalla herkkyydellä.



Kuva 3: Vuokaavio: *In situ* ELISAn suoritus MG87TrkB-soluilla

Samalla vertailtiin myös perinteisen ja *In situ* -menetelmän vaste-eroja. Menetelmien työvaiheiden erot vaikuttavat melko vähäisiltä: Perinteinen menetelmä vaatii steriiliä työskentelyä vain soluja käsitellessä. Solut kasvatetaan, stimuloidaan ja lyyssataan erillisellä, nimenomaan soluviljelyyn tarkoitetulla levyllä. Lysaatti siirretään tältä kuoppalevyllä primäärivasta-aineella etukäteen pinnoitetulle ja blokatulle ELISA-levylle. Lysaattien siirtäminen täytyy yleensä tehdä kuoppa kerrallaan, jotta suurin osa lysaatista saataisiin varmasti siirrettyä. Jos levyjä on yksi, niin toimenpide vie noin 15 min, mutta vaatii runsaasti keskittymistä, jotta kaikki lysaatti saataisiin varmasti siirrettyä ja välttyttäisiin sekoittamasta näytteitä toisiinsa. Levyjen lukumäärän ollessa suurempi, siirtäminen vie runsaasti aikaa. Yleensä lääkeaineita seulottaessa levyjen lukumäärä on erittäin suuri.

*In situ* -menetelmää käytettäessä vaaditaan jo alkumetreillä kohtuullisesti steriiliä työskentelyä. Solut kasvatetaan ELISA-levyllä soluviljelylevyn sijaan, mikä merkitsee että ELISA-levy on steriloitava UV-valolla jo ennen vasta-ainepinnoitusta. Lisäksi vasta-aineliuos ja blokkauслиuos on steriilisuodatettava ennen levyille pipetointia. Lysaatin siirtoa ei kuitenkaan tarvita, sillä vasta-ainepinnoite on sillä levyllä, millä solut lyysataan. Tämä vähentää vaadittavan käsityön määrää ja mahdollistaa menetelmän automatisoinnin. *In situ* -menetelmän käyttäminen vaikuttaa olennaisesti primäärivasta-aineen valintaan: solut maljataan käytännössä primäärivasta-aineen päälle, eikä käytettävä vasta-aine saa reagoida TrkB-reseptorin ekstrasellulaarisen osan kanssa. Tästä johtuen vasta-aineen on oltava spesifi reseptorin intrasellulaariselle osalle, jotta interaktio tapahtuisi vasta, kun solut lyysataan.

#### *Kuoppalevyvertailu*

UV-steriloitiin *In situ* -levynä toimiva 96-kuoppalevy 20 min ajan laminaarikaapissa ja pipetoitiin tämän jälkeen levyille steriilisuodatettua Optacoat-liuosta (ALerCHEK Inc.) 200 µl/kuoppa. Optacoat sisälsi 1:500 SC-11 (Polyclonal Rabbit IgG, Santa-Cruz) Trk-vasta-ainetta. Levyjen suorituskyvyn vertailuun käytettäville levyille pipetoitiin samanlainen, mutta steriilisuodattamaton liuos. Levyjä inkuboitiin 300 rpm:n ravistuksessa yön yli kylmähuoneessa (+4 °C). Levyt blokattiin pipetoimalla kuoppiin 300 µl 2 % BSA/PBS-T-liuosta ja inkuboimalla 2 h ravistuksessa huoneenlämmössä. Perinteiset ELISA-levyt siirrettiin tämän jälkeen jääkaappiin.

Poistettiin blokkauслиuos *In situ* -levyltä ja pestiin kuopat kahdesti 300 µl:lla DMEM-kasvatusmediaa, jotta kaikki blokkauслиuos saataisiin varmasti pois. Jaettiin konfluentteja MG87TrkB-soluja kasvatusmaljalta kahdelle Perkin-Elmer Cell Culture 96 -kuoppalevyille, sekä *In situ* -levylle jakosuhteessa 1:2. Levyt siirrettiin inkuboitumaan yön yli (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

Stimuloitiin soluja BDNF-pitoisuuksilla: 1, 5 ja 25 ng/ml 15 min. Negatiivisena kontrollina käytettiin pelkkää DMEM-kasvatusmediaa. (1 % PenStrep., 1 % L-Glut, 10 % FCS, G418 400 µg/ml) . Levyt siirrettiin inkubaattoriin stimuloinnin ajaksi. Stimulointi lopetettiin poistamalla kasvatusmedia levyiltä ja pipetoimalla levyille lyysipuskuria (2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> + Complete protease inhibitor Mix (Roche)), 25

µl/kuoppa. Levyjä inkuboitin 1 h 800 rpm:n ravistuksessa kylmähuoneessa perusteellisen lyysautumisen varmistamiseksi.

Poistettiin blokkauksiliuos perinteisiltä ELISA-levyiltä ja siirrettiin niille lysaattit kasvatuselevyiltä. Siirtäminen tehtiin siten, että levyt pidettiin koko ajan jäällä. Perinteisille ja *In situ* -levylle lisättiin 175 µl 2 % BSA/PBS-T-liuosta, joka oli 2 mM natriumvanadaatin suhteen tyrosiinifosfataasin inhiboimiseksi. Levyt siirrettiin +4 °C kylmähuoneeseen, missä niitä inkuboitin 300 rpm:n ravistuksessa yön yli.

Pestiin levyt neljä kertaa 300 µl:lla PBS-T-liuosta Thermo Scientific Well Wash -kuoppalevypesuria käyttäen. Levyille pipetoitiin 200 µl 2 % BSA/PBS-T-liuosta, mikä sisälsi 1:1000 laimennettua biotiini-konjugoitua fosfotyrosiini-vasta-ainetta PY-20 (Mouse monoclonal IgG, BioRad). Levyjä inkuboitin jälleen kylmähuoneessa 300 rpm:n ravistuksessa yön yli.

Levyt pestiin jälleen edellä mainitulla pesuohjelmalla. Tämän jälkeen levyille pipetoitiin 200 µl 2 % BSA/PBS-T, mikä sisälsi 1:10000 laimennettua HRP-konjugoitua streptavidiinia (ImmunoPure®, Thermo Scientific). Levyjä inkuboitin 2 h huoneenlämmössä 300 rpm:n ravistuksessa ja pestiin ne inkuboinnin jälkeen kuoppalevypesurin pesuohjelmalla. Levyille pipetoitiin 100 µl ECL-reagenssia (Thermo Scientific) ja mitattiin luminesenssi Thermo Scientific variokan-kuoppalevylukijalla.

#### 4.2 Viabiliteetti eri pinnoitteilla

Vertailtiin erilaisten pinnoitusmenetelmien vaikutusta primäärihermosolujen morfologiaan ja viabiliteettiin.

##### *Primäärihermosoluviljelmien valmistus*

Suihkutettiin lopetetun kantavan rotan alavatsa 60-prosenttisella etanolilla. Leikattiin alavatsa auki, nostettiin sikiöpusseja pinseteillä ja leikattiin ne irti kohdusta, jonka jälkeen siirrettiin ne jääkylmään PBS:ään. Sikiökalvo leikattiin auki, embryo poimittiin pussin sisältä ja napanuora katkaistiin. Pääts irrotettiin leikkaamalla ja siirrettiin ne petrialjalle, jolla oli jääkylmää PBS:ää. Pidettiin päätä paikallaan atuloilla

silmäkuoppien kautta ja kuorittiin ihokerrosta pois pinseteillä. Leikattiin kallo auki takaa sekä sivuilta ja painettiin aivot varovasti ulos pinseteillä. Siirrettiin aivot jäällä olevalle petrimaljalle, jossa oli preparointiliuosta (Hank's Balanced Salt Solution w/o Ca and Mg (Gibco®) + 1 mM Natriumpyruvate (Sigma) + 10 mM HEPES pH 7,2 (Gibco®)). Dissekoitiin aivot mikroskoopin alla leikkaamalla aivopuoliskot irti toisistaan ja poistamalla pikkuaivot. Poistettiin hajukäämit ja aivokalvo verisuonineen. Myös hippokampus poistettiin leikkaamalla se varovasti irti aivokuoresta (myöh. *korteksi*).

Siirrettiin korteksit DMEM:iin (1% PenStrep, 1% L-Glut, 10% FCS) ja trituroitiin 20G-neulaa käyttäen. Sentrifugoitiin seosta 5 min 100 G:n voimakkuudella huoneenlämmössä. Poistettiin supernatantti ja suspendoitiin pelletti DMEM:iin. Annettiin liuoksen seistä 4 min jotta ylimääräinen debris laskeutuisi pohjalle. Siirrettiin supernatantti tästä tavalliselle petrimaljalle, joka ei ole otollinen neuronien kiinnittymiselle. Petrimalja siirrettiin inkubaattoriin (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) puoleksi tunniksi, jotta glia-solut kiinnittyisivät sen pohjaan. Tämän jälkeen kerättiin supernatantti talteen varoen samalla ottamasta pohjalle kiinnittyneitä glia-soluja. Sentrifugoitiin supernatanttia 5 min 100 G:n voimakkuudella ja suspendoitiin pelletti neurobasal-kasvatusmediaan (2 % B27-supplement, 1 % PenStrep, 1% L-Glut.). Annettiin suspension seistä 5 minuuttia ja siirrettiin supernatantti uuteen putkeen.

Solut maljattiin taulukon 6 mukaisesti pinnoitetuille Optiplate- ja Isoplate-levyille (4 kaivoa ryhmää kohti). SC-11 Optacoatissa vastasi niitä olosuhteita, joilla fibroblasteille tarkoitettu *In situ* -levy pinnoitetaan, kun taas PLL vedessä vastasi niitä olosuhteita, joilla primäärihermosoluviljelmät tavallisesti pinnoitetaan.

Taulukko 6: Pinnoitevertailu

| <b>Pinnoitusreagenssi</b> | <b>Liuos</b> |
|---------------------------|--------------|
| Poly-L-Lysiini 0,001 %    | Vesi         |
| Laminiini 6,67 µg/ml      | Vesi         |
| Laminiini 20 µg/ml        | Vesi         |
| Optacoat SC-11 1:500      | Optacoat     |
| Laminiini 6,67 µg/ml      | Optacoat     |
| Laminiini 20 µg/ml        | Optacoat     |

Levyjä inkuboitiin 3 vrk primäärihermosolujen kanssa ja suoritettiin toiselle levyistä ATP-tuottoon perustuva viabiliteetti-testi Promegan "Cell Titer Glo"-kitin ohjeen mukaan [27]. Luminesenssi luettiin Perkin-Elmer Victor-kuoppalevynlukijalla. Toisen levyn solut kuvattiin Olympuksen IX-70-mikroskooppiin liitetyn QImaging-kameran avulla.

### 4.3 Poly-L-lysiinin vaikutus vasta-aineisiin

Aikaisempien kokeiden perusteella poly-L-lysiinin on todettu häiritsevän *In situ*-menetelmää aiheuttamalla runsaasti taustasignaalia. Lähdettiin kartoittamaan mikä tai mitkä käytetyistä vasta-aineista olivat syy tähän. Taustasignaalia eniten aiheuttavalle vasta-aineelle pyrittiin löytämään vaihtoehtoinen vasta-aine. Tässä kokeessa ei käytetty lainkaan soluja, jotta nähtäisiin mahdollisimman selkeä taustasignaali ilman minkäänlaista analyyyttiä tai näytematriisia.

#### *Käytettävien vasta-aineiden tarkistus*

UV-steriloitiin ja pinnoitettiin Optiplate puoliksi 0,001% poly-L-lysiinillä, 200 µl kaivoa kohden. Siirrettiin levy inkubaattoriin 60 min:ksi. Poistettiin PLL levyltä ja pestiin kaivot 3 kertaa 300 µl:lla PBS-liuosta. Osa kaivoista pinnoitettiin 200 µl:lla Optacoatin ja SC-11-vasta-aineen yhdistelmällä (1:500) ja osaan pipetoitiin pelkkää Optacoat-liuosta. Levyä inkuboitiin kylmähuoneessa +4 °C 300 rpm:n ravistuksessa yön yli.

Poistettiin liuokset levyltä ja blokattiin levy puoliksi 300 µl:lla 2 % BSA/PBS-T-liuosta. Blokkaamattomalle puolelle pipetoitiin PBS-T ilman BSA:ta. Inkuboitiin levyä 2 h huoneenlämmössä 300 rpm:n ravistuksessa. Pestiin levy kuoppalevypesurin ohjelmalla ja pipetoitiin sekundäärivasta-aineet kaivoihin taulukon 7 mukaisesti. Vasta-ainetta sisältävissä ryhmissä laimennossuhde oli 1:1000 ja tilavuus kaikissa 200 µl.

Taulukko 7: Sekundäärivasta-aineiden ryhmät

| Ryhmä                          | Vasta-aine | Liutotin     |
|--------------------------------|------------|--------------|
| Blokattu, vasta-aine           | PY-20biot. | 2% BSA/PBS-T |
| Blokkaamaton, vasta-aine       | PY-20biot. | PBS-T        |
| Blokattu, ei vasta-ainetta     | -          | 2% BSA/PBS-T |
| Blokkaamaton, ei vasta-ainetta | -          | PBS-T        |

Siirrettiin levy kylmähuoneeseen yön yli 300 rpm:n ravistukseen. Levy pestiin tämän jälkeen kuoppalevypesurin ohjelmalla ja pipetoitiin tertiäärivasta-aineet levyille taulukon 8 mukaisesti. Vasta-ainetta sisältävissä ryhmissä laimennossuhde oli 1:10000 ja tilavuus 200 µl.

Taulukko 8: Tertiäärivasta-aineiden ryhmät

| Ryhmä                          | Vasta-aine       | Liutotin     |
|--------------------------------|------------------|--------------|
| Blokattu, vasta-aine           | Streptavidin-HRP | 2% BSA/PBS-T |
| Blokkaamaton, vasta-aine       | Streptavidin-HRP | PBS-T        |
| Blokattu, ei vasta-ainetta     | -                | 2% BSA/PBS-T |
| Blokkaamaton, ei vasta-ainetta | -                | PBS-T        |

Levyä inkuboitiin 2 h huoneenlämmössä 300 rpm:n ravistuksessa. Tämän jälkeen levy pestiin ja detektoitiin protokollan mukaan, rinnakkaisia näytteitä oli 6 ryhmää kohti.

#### *Vaihtoehtoinen sekundäärivasta-aine*

Pyrittiin kartoittamaan vaihtoehtoisia vasta-aineita biotiinikonjugoidulle PY-20:lle. Sekundäärivasta-ainetta vaihtaessa myös tertiääri oli vaihdettava, sillä biotiinikonjugoimatonta vasta-ainetta ei voida tunnistaa streptavidiinilla. Menetelmä suoritettiin jakamalla Optiplat-kuoppalevy neljään osaan, joista jokaiseen käytettiin eri sekundäärivasta-ainetta (taulukko 9). Useiden BDNF-annosten sijaan käytettiin soluttomia kaivoja, stimuloimattomia soluja ja yhtä ryhmää, jota stimuloitiin 20 ng/ml BDNF-pitoisuudella. Ryhmään, jossa tertiäärivasta-ainetta ei tarvittu lainkaan, HRP-



konjugoidun sekundääriin vuoksi, pipetoitiin aluksi pelkkä 2 % BSA/PBS-T, jotta inkubointiaika vasta-aineryhmien välillä olisi yhtenevä.

UV-steriloitiin optiplate ja pinnoitettiin koko levy 200 µl:lla 0,001 % poly-L-lysiiniä. Siirrettiin levy inkubaattoriin 60 min:ksi. Normaalin primääripinnoituksen ja blokkauksen jälkeen pestiin levytä blokkausliuos pois kahdesti 300 µl PBS-liuosta, sekä kerran 300 µl neurobasalia. Pipetoitiin levyille vastikään protokollan mukaisesti preparoituja kortikaalisia neuroneita osalle kaivoista, 34 000 solua kaivoa kohti 150 µl:ssa NB+-kasvatusmediaa. Levyä inkuboitiin yön yli (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

Stimuloitiin osaa soluista BDNF-pitoisuudella 20 ng/ml 15 min. Negatiivisena kontrollina käytettiin pelkkää neurobasalia. Lyysauksen ja antigeenin sitoutumisinkuboinnin jälkeen pestiin levy kuoppalevypesurilla ja pipetoitiin sekundäärivasta-aineet levyille. Ryhmään, jossa ei ollut tertiäärivasta-ainetta lainkaan, pipetoitiin pelkkä 2 % BSA/PBS-T. Suoritettiin inkuboinnit ja pesut, minkä jälkeen levyille pipetoitiin tertiäärivasta-aineita ja yhteen ryhmistä sekundääri, menetelmä vietiin loppuun protokollan mukaisesti. Rinnakkaisia kaivoja oli 8 kpl ryhmää kohti. Kaikki vasta-aineet laimennettiin 2 % BSA/PBS-T-liuosta käyttäen. Vasta-aineet pipetoitiin taulukon 9 mukaisesti.

Taulukko 9: Vaihtoehtoiset sekundäärivasta-aineet

| <b>Sekundäärivasta-aine (laimennos) [inkubointi]</b> | <b>Tertiäärivasta-aine (laimennos) [inkubointi]</b> |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| PY-20 (1:1000) [o/n]                                 | Goat Anti-Mouse HRP (1:10000) [2 h]                 |
| PY-20 HRP (1:1000) [2 h]                             | -                                                   |
| PY-20-biotin (1:1000) [o/n]                          | Streptavidin HRP (1:10000) [2 h]                    |
| 4G10 (1:5000) [o/n]                                  | Goat Anti-Mouse HRP (1:10000) [2 h]                 |

#### 4.4 Poly-L-lysiinin konsentraatio ja tilavuus

Vaikka vasta-aine oli jo vaihdettu, niin päätettiin kokeilla, voisiko signaali-kohina-suhdetta parantaa poly-L-lysiinin konsentraatiota ja tilavuutta muuttamalla. Ensimmäiseksi oli tarpeen kokeilla, miten poly-L-lysiinin konsentraatio vaikuttaa normaalin primäärihermosoluviljelmän morfologiaan ja BDNF-vasteeseen. Muuttujien minimoimiseksi päätettiin käyttää kokeeseen perinteistä menetelmää. Käytettävä Tissue Culture -levy jaettiin kolmeen osaan ja pinnoitettiin kaivot poly-L-lysiini-

laimennoksilla 0,001 %, 0,0001 % ja 0,00002 %. Soluja inkuboitiin 48 h, minkä jälkeen ne kuvattiin, stimuloitiin ja lyysattiin. Lysaatit siirrettiin perinteiselle pTrk-ELISA-levylle.

Pinnoitettiin Perkin-Elmer Tissue Culture 96-kuoppalevy edellä mainituilla PLL-laimennoksilla. Levyä inkuboitiin 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> yön yli. Vasta-ainepinnoitettiin ja blokattiin ELISA-levy protokollan mukaan. Poistettiin PLL-liuokset Tissue Culture-levyltä ja pestiin kuopat kahdesti 300 µl PBS-liuosta. Pipetoitiin levyllä vastikään preparoituja kortikaalisia neuroneita 100 000 solua kaivoa kohti. Inkuboitiin levyä 48 h, minkä jälkeen kuvattiin solut ja stimuloitiin niitä 15 min BDNF-pitoisuuksilla 1,25, 2,5, 5, 10 ja 20 ng/ml. Stimuloinnin lopetus ja solujen lyysaus suoritettiin protokollan mukaan. Lysaatit siirrettiin ELISA-levylle ja suoritettiin loppuun protokollan mukaan. Käytetty vasta-aineyhdistelmä oli 4G10 (1:10000) ja Goat Anti-Mouse HRP (1:10000).

#### 4.5 Primäärisoluviljelmien iän vaikutus

Perinteistä protokollaa käyttäessä neuroneita kasvatetaan erillisellä levyllä yleensä vähintään viikko. Solut ehtivät hädin tuskin kiinnittymään alustaansa, jos levyä inkuboidaan vain yksi yö. Neuriittien järjestäytyminen vie vähintään kaksi yötä ja synapsien kehittyminen vaatii vielä pidemmän ajan [28]. Tavoitteena oli selvittää, saadaanko selkeämpi BDNF-vaste, mikäli levyjä inkuboidaan pidempiä aikoja.

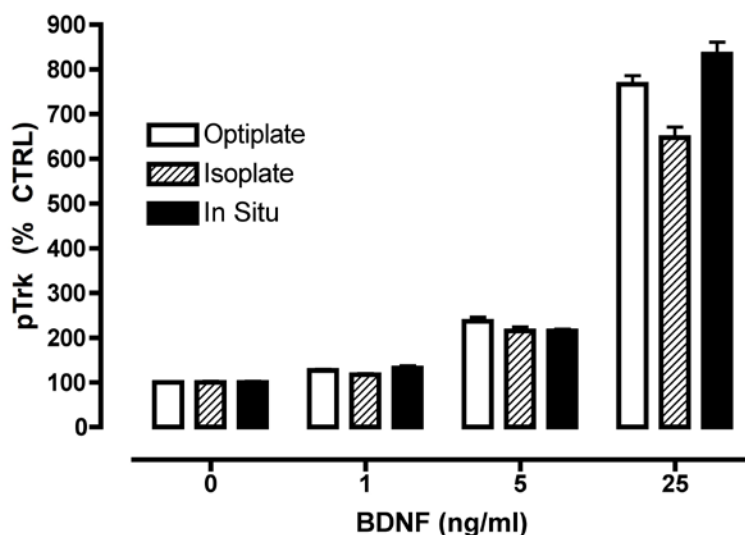
Verrattiin aluksi yhden päivän ajan inkuboitujen solujen BDNF-vastetta kahden päivän ajan inkuboitujen solujen vasteeseen, minkä jälkeen suoritettiin samanlainen analyysi 3, 6 ja 14 päivän inkuboinneilla. Levyjen pinnoitukseen käytettiin 50 µl 0,0001 % poly-L-lysiiniä 30 min huoneenlämmössä. Vasta-ainepinnoitus ja blokkaukset suoritettiin tavalliseen tapaan. Valmisteltiin lisäksi yksi Isoplate, jota voitiin hyödyntää solujen kuvaamisessa tasaisin väliajoin. Soluja pipetoitiin levyille 100 000 kaivoa kohti. Levyiltä, joita inkuboitiin yli 3 vrk, kolmasosa kasvatusmediasta vaihdettiin kaksi kertaa viikossa.

## 5 Tulokset

Laitteiden antamat vasteet analysoitiin Microsoft Excelillä, jolla muutettiin absoluuttiset arvot prosentuaaliseksi arvoksi kontrollin suhteen. Tilastolliset analyysit ja tulosten graafinen toteutus suoritettiin GraphPad Prismiä hyödyntäen.

### 5.1 Kuoppalevyvertailu

Tässä MG87TrkB-soluilla tehdyssä vertailussa Optiplatella saatiin voimakkaampi signaali kuin Isoplatella. Tulos oli jokseenkin odotettavissa, sillä läpinäkyvästä pohjasta koostuva Isoplate ei ole aivan omiaan luminesenssin mittauksessa pohjaan kiinnitettävästä tarrasta huolimatta. Tämä johtuu todennäköisimmin siitä, että valovuodon määrä kasvaa merkittävästi, etenkin suurilla annoksilla, kun luminesenssi on voimakasta. 2-suuntaisella ANOVA:lla tarkastellessa merkittävä ero saatiin vasta 25 ng/ml BDNF-annoksella ( $n=6$ ,  $P < 0,001$ ) (kuvio 1). Tämän tiedon valossa, päätettiin käyttää Isoplatea ainoastaan, kun solujen näkeminen on välttämätöntä, esimerkiksi kuvaamisen vuoksi.



Kuvio 1: Trk-fosforylaatio (%-kontrollista) BDNF-annoksen funktiona: Kuoppalevyjen vertailu

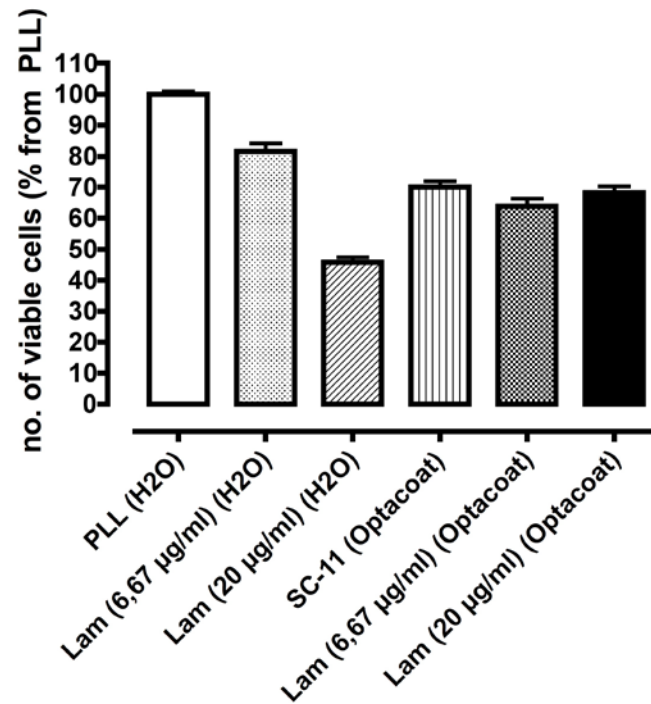
Samalla analyysikerralla tarkasteltiin myös perinteisen ja *In situ* -menetelmän eroa. Ero saatiin jälleen voimakkaimmalla annoksella ( $n= 6$ ,  $P= < 0,05$ ) ja vastoin odotuksia, *In Situ*-menetelmän eduksi.

On vielä painotettava, että MG87TrkB-soluilla suoritettava *In situ* ei vaadi minkäänlaista pinnoitusta primäärivasta-ainepinnoituksen lisäksi ja on luultavaa, että ne vastaavat BDNF-stimulaation neuroneita voimakkaammin. Tämä saattaa johtua niiden ominaisuudesta yliekspressoitua TrkB-reseptoria solukalvolla [29].

## 5.2 Viabiliteetti eri pinnoitteilla

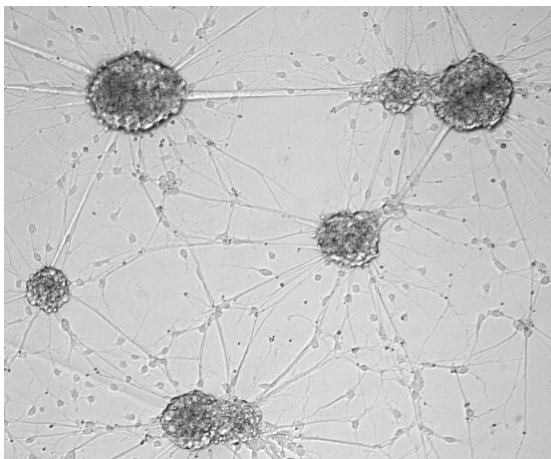
Pinnoitevertailussa käytettiin yleisesti primäärihermosoluvlijelmissä käytettävää poly-L-lysiiniä ja laminiinia, jälkimmäistä pääasiassa kirjallisuustiedon valossa [30]. Lähtökohtaisesti ei ollut tietoa siitä, miten laminiini toimisi yksinään ja mihin se tulisi laimentaa. Tämän vuoksi päädyttiin laimentamaan se kahteen eri liuokseen; veteen ja Optacoat-liuokseen, jota käytetään myös primäärivasta-ainepinnoituksessa. Oikeanlainen konsentraatio oli myös epäselvä, joten kokeiltiin kahta erilaista laimennosta. Pelkällä Optacoatin ja vasta-aineen yhdistelmällä pinnoitettua ryhmää käytettiin neuronien viabiliteetin selvittämiseen MG87TrkB-solujen kasvuun riittävässä olosuhteissa. Vastaavasti ryhmä, jossa käytettiin poly-L-lysiiniä, mukaillee niitä olosuhteita, joissa primäärihermosolut tavallisesti kasvatetaan.

Käytetty viabiliteetti-assay mittaa solujen tuottamaa ATP:ta, joka on teoriassa verrattavissa niiden elinvoimaisuuteen. Mitään varsinaista kontrollia ei ollut, mutta ryhmien vasteet suhteutettiin poly-L-lysiinin-ryhmän vasteisiin (kuvio 2). Rinnakkaisten näytteiden määrä oli tässä tapauksessa 4.

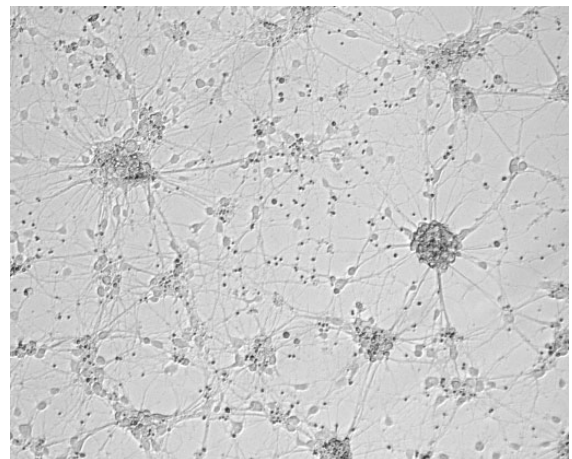


Kuvio 1: Viaabilien solujen lukumäärä (% PLL-näytteestä) pinnoitteen funktiona (n= 4)

Morfologia kertoo primäärihermosolujen tapauksessa paljon niiden hyvinvoinnista. Ryppäitä muodostaneet (*klusteroituneet*) solut osoittavat pinnoituksen riittämättömyyden kiinnittymällä mielummin toisiinsa, kuin kuoppalevyn pohjaan (kuva 4). Pelkkää viabiliteettia tarkastellessa myös laminiini veteen liuotettuna (6,67 µg/ml) vaikuttaa melko hyvältä vaihtoehdolta, mutta kun ryhmästä otettua kuvaa tarkastellaan, tulokset viittaavat morfologian perusteella siihen, että poly-L-lysiini on paras vaihtoehto solujen henkiinjäämisen kannalta (kuva 5).



Kuva 4: Neuronit laminiinilla (400x suurennos)

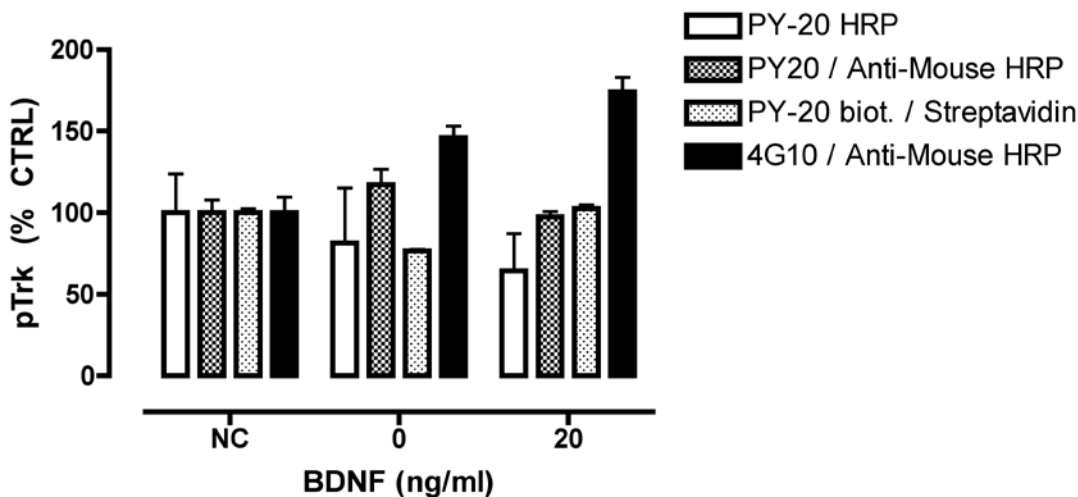


Kuva 5: Neuronit Poly-L-lysiinillä (400x suurennos)

### 5.3 Vasta-aineet

Poly-L-lysiiniä käytettäessä kyseisen protokollan kanssa on saatu tuloksia, joissa taustasignaali, eli niin sanottu nolla-taso on liian korkea, että menetelmä olisi käyttökelpoinen. Tämän taustasignaalin todennäköiseksi syyksi epäiltiin käytettävien vasta-aineiden epäspesifistä sitoutumista PLL-pinnoitetun kuoppalevyn pohjaan. Opinnäytetyössä tutkittiin, mikä vasta-aineista olisi pääsyynä tausta-signaaliin. Käytettävien vasta-aineiden tarkistamisen jälkeen päädyttiin siihen, että epäspesifistä signaalia aiheutti eniten biotiinikonjugoitu PY-20 (tuloksia ei esitetty). Syyksi pääteltiin kirjallisuudesta löydetty tieto siitä, että biotiinilla on taipumus sitoutua kovalenttisesti lysiinijäämiin ja sitä kautta myös poly-L-lysiiniin. Tämä sekundäärivasta-aineen ylimäärä pohjassa aiheuttaisi varmasti suuren taustasignaalin. [31.]

Nämä päätelmät valottuivat entisestään kokeen jälkeen, jossa vertailtiin myös biotiinikonjugoimattomia PY-20-vasta-aineita. Biotiinin puuttumisesta huolimatta, kyseinen vasta-aine aiheutti useissa tapauksissa eniten signaalia silloin, kun kuoppalevyllä ei edes ollut soluja (kuvio 3). Mukaan oli otettu myös vaihtoehtoinen fosfotyrosiini-vasta-aine 4G10. Tulosten perusteella sen pääteltiin olevan ainoa varteenotettava vaihtoehto, mikäli poly-L-lysiiniä aiottiin käyttää pinnoitteena. Kirjallisuudesta löydettiin myös tieto, jonka perusteella PY-20 on herkkä sitoutumaan positiivisesti varautuneiden aminohappojen sivuketjuihin [32]. Koska lysini on positiivisesti varautunut aminohappo, tämä olisi hyvin todennäköinen selitys epäspesifiselle sitoutumiselle.

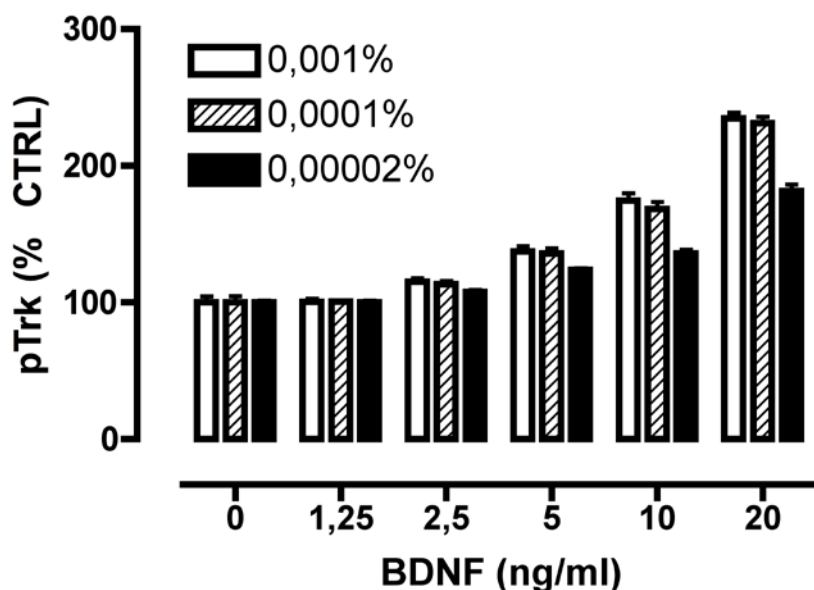


Kuvio 2: Trk-fosforylaatio/epäspesifinen signaali (% kontrollista) BDNF-annoksen funktiona

#### 5.4 Poly-L-lysiinin konsentraatio

Koska vasta-aineen vaihtamisesta huolimatta herkkyys ei ollut vielä lähelläkään toivottua tasoa, niin päätettiin kokeilla pienentää PLL-pinnoituksen konsentraatiota. Ajateltiin, että pienempi konsentraatio aiheuttaisi vähemmän epäspesifistä sitoutumista ja terävöittäisi erityisesti suurilla annoksilla pienentuntuiseksi jääviä vasteita. Ensimmäiseksi oli selvitettävä, vaikuttaisiko konsentraation muuttaminen solujen BDNF-vasteeseen.

Merkittävää eroa ei havaittu, kun 0,001 % ja 0,0001 % pinnoitusten tuloksia tarkasteltiin 2-suuntaisen ANOVAn avulla (n= 4). Sen sijaan 0,00002 % erosi edellä mainituista ryhmistä merkittävästi, eikä sitä voida näin ollen käyttää madaltuneen vasteen vuoksi, joka todennäköisesti johtuu suuremmasta määrästä kuolleita soluja. Tulokset ovat esitettynä kuviossa 4. Eroja konsentraatioiden välillä tarkasteltiin myös morfologian perusteella, eikä ryhmien 0,001 % ja 0,0001 % välillä havaittu silminnähtävää eroa. Optimaaliseksi konsentraatioksi vasta-aineparilla 4G10 ja Anti Mouse HRP saatiin siis 10-kertaisesti alkuperäisiä olosuhteita pienempi konsentraatio.



Kuvio 3: Trk-fosforylaatio (% kontrollista) BDNF-annoksen funktiona: poly-L-lysiinin konsentraatiovertailu

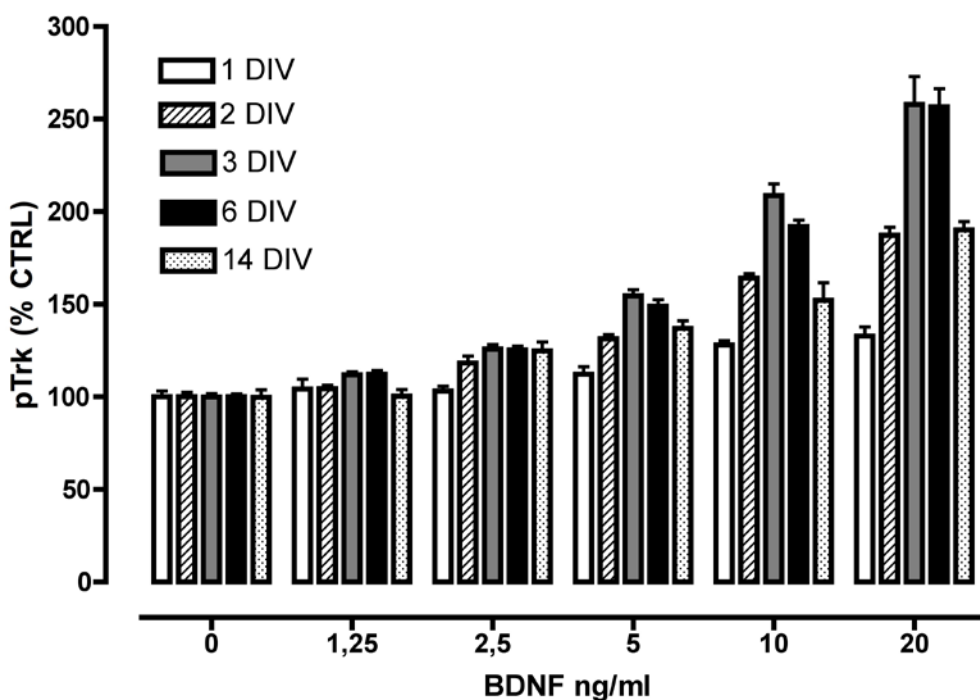
### 5.5 Inkubaatioaika

Tehdyistä muutoksista huolimatta signaalin suhde taustaan ei ollut vieläkkään toivotulla tasolla. Yleisesti ottaen perinteistä protokollaa suorittaessa, neuroneita on inkuboitu keskimäärin viikko ennen stimuloitua ja lyysausta. Tämän tiedon valossa lähdettiin kokeilemaan pidempiä inkubaatioaikoja. Suurin epävarmuus liittyi siihen, miten hyvin primäärivasta-aine kestäisi usean päivän inkuboinnin, sillä useimmat vasta-aineet on säilytettävä +4 °C:ssa, jotta ne pysyisivät stabiilina. Usean päivän altistuminen 37 °C:n lämpötilalle saattaisi aiheuttaa vasta-aineiden hajoamista [33]. Lisäksi joillain soluilla on taipumus erittää proteiineja pilkkovia proteaaseja kasvatusmediaan, mikä saattaisi kiihdyttää vasta-aineiden hajoamista entisestään [34; 35].

Jo kahden ja yhden päivän välillä havaittiin selkeä ero vasteessa (kuvio 5). 3 ja 6 vrk:n ikäisissä soluissa vaste parani entisestään, mutta niiden välillä eroa ei havaittu kuin yhdellä stimulaatio-annoksista. 14 vrk:n ikään päästäessä tarkasteltiin soluja mikroskoopilla ja todettiin, että merkittävä osa levyllä olevista soluista oli todennäköisesti kuollut. Tämä voi johtua osittain kasvatusmedian haihtumisesta, sillä solukato oli kaikista ilmeisin reunimmaisissa kaivoissa. Tuloksia tarkastellessa vaste oli melko samankaltainen 2 vrk:n ikäisten neuronien kanssa. On luultavaa, että pienennetty pinnoituskonsentraatio ei kykene pitämään soluja hengissä yhtä pitkiä



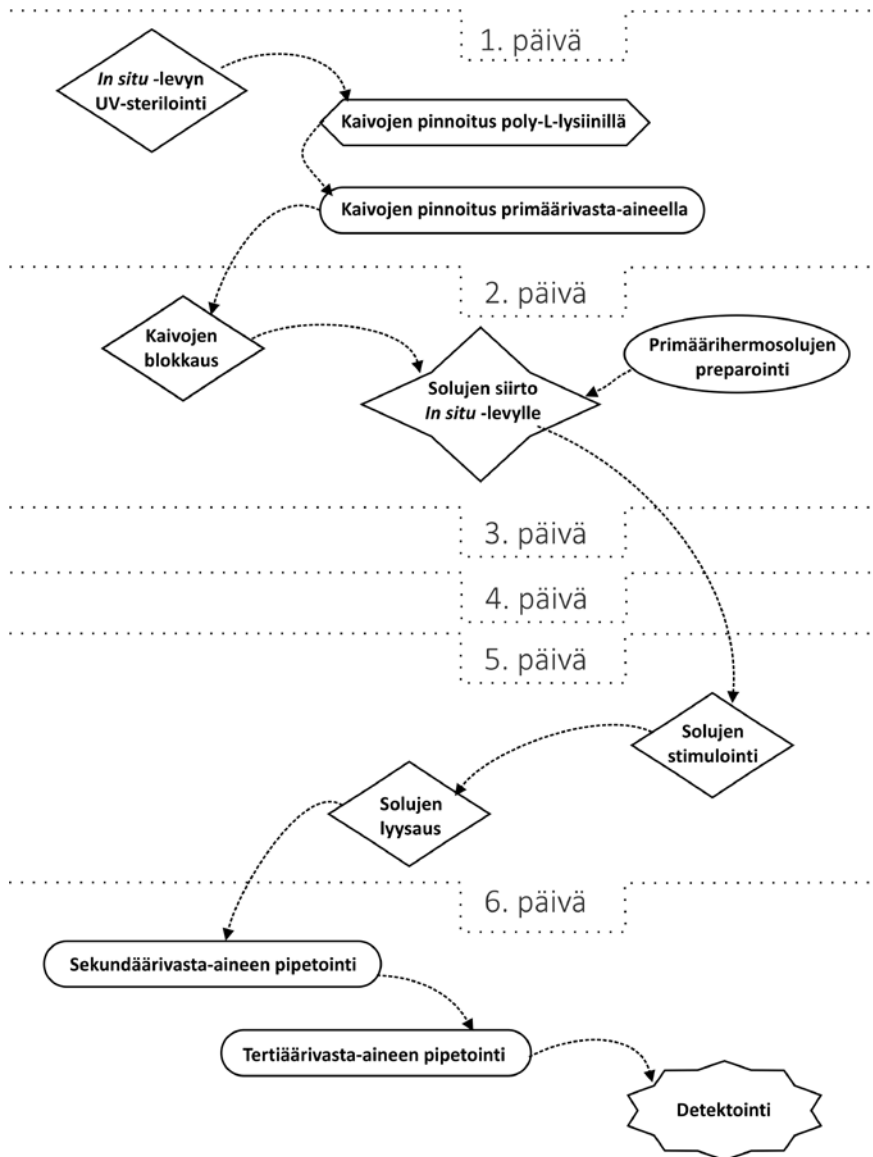
aikoja, kuin yleisesti viljelmissä käytössä oleva 0,001% konsentraatio. Lisäksi osa vasta-aineesta saattaa aikaisemman spekulaation tapaan olla hajonnut. Paras vaste näissä olosuhteissa saatiin 3 - 6 vrk:n ikäisillä soluilla ( $n \geq 7$ ).



Kuvio 4: Trk-fosforylaatio (% kontrollista) BDNF-annoksen funktiona: inkubointipäivien vaikutus vasteeseen

## 5.6 Optimoitu menetelmä

Optimoituun menetelmään (kuva 6) sisältyy PLL-pinnoitusvaihe, joka suoritetaan ennen primäärivasta-ainepinnoitusta (pinnoituskonsentraatio 0,0001%). Soluja tulisi optimoinnin perusteella inkuboida 3 - 6 vuorokautta ennen stimulointia ja lyysausta. Sekundäärivasta-aine vaihdettiin alkuperäisen menetelmän biotiinikonjugoidusta PY-20:stä (laimennossuhde 1:1000) 4G10:n (laimennossuhde 1:5000). Tämän seurauksena myös tertiäärivasta-aine vaihdettiin HRP-konjugoidusta streptavidiinista HRP-konjugoituun Goat Anti-Mouseen (molempien laimennossuhde 1:10000). Koska analyysiaika pitkittyi alkuperäiseen menetelmään verrattuna solujen inkuboinnista johtuen vähintään kolmella vuorokaudella, päätettiin inkubointiaikaa tertiäärivasta-aineen suhteen lyhentää yön yli tehtävästä inkuboinnista 2 tuntiin.



Kuva 4: Vuokaavio: primäärihermosoluille optimoidun *In situ* ELISAn suoritus

## 6 Yhteenveto

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida fibroblasti-soluille kehitetty *In Situ* ELISA-menetelmä primärihermosoluille. Vaikka menetelmän signaalin suhde taustaan ei ole vielä toivotulla tasolla, niin projektin aikana signaalia onnistuttiin terävöittämään huomattavasti. Herkkyyttä optimoimalla olisi mahdollista saada täysin käyttökelpoinen menetelmä, jota voidaan hyödyntää automatisoiduissa lääkeaineseulonnoissa. Menetelmä on jo nyt valmis käytettäväksi, mutta lisäoptimointia tullaan vielä todennäköisesti tekemään. Suurin rajoitteita aiheuttava tekijä optimoinnin aikana oli matala signaali-kohina-suhde. Tämä johti siihen, että primärihermosoluja tarvittiin suurempia määriä kuin mitä usein oli saatavilla.

Menetelmää voisi edelleen optimoida esimerkiksi jättämällä yli 6 vrk:n inkubointien yhteydessä reunimmaisat kaivot käyttämättä kokonaan ja täyttää ne esimerkiksi PBS:llä. Tämä ehkäisisi kasvatusmedian haihtumista muista kaivoista ja voisi mahdollistaa useamman solun henkiinjäämisen. Tämä voisi parantaa vastetta huomattavasti yli viikon ikäisillä viljelmillä, sillä vaikuttaa siltä, että primäärivasta-aine kestää inkubaattorin olosuhteita suhteellisen hyvin. Herkkyyttä voisi parantaa myös toista sekundäärivasta-ainetta kokeilemalla. Esimerkiksi suoraan HRP-konjugoitu 4G10 lyhentäisi analyysiaikaa vähintään kahdella tunnilla.

On epäselvää, kuinka monta eri proteiinia käytettyjen vasta-aineiden yhdistelmä itse asiassa tunnistaa. Spesifisyyden voisi tarkistaa suorittamalla lyaateille immunopresipitaation SC-11:a käyttäen ja sen jälkeen suorittamalla näytteille Western Blot -analyysi käyttämällä 4G10:ä primäärivasta-aineena. On todennäköistä, että vasta-aineet tunnistavat ainakin fosforyloituneet TrkA- ja TrkC-reseptorit. BDNF-stimulointi ei aktivoi näitä reseptoreja, mutta stimuloidessa jollain lääkeaineella niiden osuus voisi kasvaa merkittävästi.

Primärihermosolujen käyttäminen menetelmässä mahdollistaa myös muiden mielenkiintoisten proteiinien fosforylaation mittaamisen. Eräs kohde olisi Tau-proteiini, johon liittyvät häiriöt on yhdistetty muun muassa Alzheimerin tautiin [36]. Muiden proteiinien analysointi vaatisi parhaassa mahdollisessa tapauksessa vain vasta-aineiden vaihtamisen.

Menetelmä olisi tulevaisuudessa tarkoitus siirtää 96-kuoppalevyllä 384-levylle täysin automatisoitua lääkeaineseulontaa varten. Inhimillisen virheen merkitys pienenee robotin hoitaessa kaikki pipetoinnit, ja tämän olettaisi vaikuttavan tulosten varianssiin. On vielä epäselvää, miten hyvin menetelmän siirtäminen onnistuu ilman suurempia muutoksia. Suurin epävarmuus liittyy siihen, miten hyvin primäärineuronit kasvavat yli puolet pienemmällä pinta-alalla. Lisäksi haihtumisen merkitys kasvaa suuresti yli puolet pienemmässä tilavuudessa.

## Lähteet

- [1] Hales R. E. and Yudofsky S. C., Eds., *The American Psychiatric Publishing textbook of clinical psychiatry*, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Pub, 2003.
- [2] Rantamäki T., "Brain TrkB neurotrophin receptor as a target for antidepressant treatments," *Masennuslääkkeiden vaikutukset aivojen muovautuvuutta säätelevän TrkB reseptorin toimintaan*, Oct. 2006.
- [3] Kozisek M. E., Middlemas D., and Bylund D. B., "Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies," *Pharmacol. Ther.*, vol. 117, no. 1, pp. 30–51, Jan. 2008.
- [4] Gary B. D. C., Lewin R., Ed., *Neurotrophic Factors*, vol. 220. Springer, 2014.
- [5] Pruunsild P., Kazantseva A., Aid T., Palm K., and Timmusk T., "Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters," *Genomics*, vol. 90, no. 3, pp. 397–406, Sep. 2007.
- [6] Lu B., Pang P. T., and Woo N. H., "The yin and yang of neurotrophin action," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 6, no. 8, pp. 603–614, Aug. 2005.
- [7] Teng H. K., Teng K. K., Lee R., Wright S., Tevar S., Almeida R. D., Kermani P., Torkin R., Chen Z.-Y., Lee F. S., Kraemer R. T., Nykjaer A., and Hempstead B. L., "ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 25, no. 22, pp. 5455–5463, Jun. 2005.
- [8] Haniu M., Talvenheimo J., Le J., Katta V., Welcher A., and Rohde M. F., "Extracellular domain of neurotrophin receptor trkB: disulfide structure, N-glycosylation sites, and ligand binding," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 322, no. 1, pp. 256–264, Sep. 1995.

- [9] Watson F. L., Porcionatto M. A., Bhattacharyya A., Stiles C. D., and Segal R. A., "TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity," *J. Neurobiol.*, vol. 39, no. 2, pp. 323–336, May 1999.
- [10] Arevalo J. C., Conde B., Hempstead B. L., Chao M. V., Martin-Zanca D., and Perez P., "TrkA Immunoglobulin-Like Ligand Binding Domains Inhibit Spontaneous Activation of the Receptor," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 16, pp. 5908–5916, Aug. 2000.
- [11] Huang E. J. and Reichardt L. F., "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 72, pp. 609–642, 2003.
- [12] Rantamäki T., Hendolin P., Kankaanpää A., Mijatovic J., Piepponen P., Domenici E., Chao M. V., Männistö P. T., and Castrén E., "Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-C $\gamma$  signaling pathways in mouse brain," *Neuropsychopharmacology*, vol. 32, no. 10, pp. 2152–2162, 2007.
- [13] Saarelainen T., Hendolin P., Lucas G., Koponen E., Sairanen M., MacDonald E., Agerman K., Haapasalo A., Nawa H., Aloyz R., and others, "Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects," *J. Neurosci.*, vol. 23, no. 1, pp. 349–357, 2003.
- [14] Lequin R. M., "Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)," *Clin. Chem.*, vol. 51, no. 12, pp. 2415–2418, Dec. 2005.
- [15] Rogan M. T., Craig P. S., Zeyhle E., Romig T., Lubano G. M., and Deshan L., "Evaluation of a rapid dot-ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 85, no. 6, pp. 773–777, Dec. 1991.
- [16] Crowther J. R., *The ELISA guidebook*. Totowa, NJ: Humana Press, 2000.
- [17] Antila H., Autio H., Turunen L., Harju K., Tammela P., Wennerberg K., Yli-Kauhaluoma J., Huttunen H. J., Castrén E., and Rantamäki T., "Utilization of in situ ELISA method for examining Trk receptor phosphorylation in cultured cells," *J. Neurosci. Methods*, vol. 222, pp. 142–146, Jan. 2014.

[18] Martin M. G., Perga S., Trovò L., Rasola A., Holm P., Rantamäki T., Harkany T., Castrén E., Chiara F., and Dotti C. G., "Cholesterol loss enhances TrkB signaling in hippocampal neurons aging in vitro," *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, no. 5, pp. 2101–2112, May 2008.

[19] Zhou X., Xiao H., and Wang H., "Developmental changes of TrkB signaling in response to exogenous brain-derived neurotrophic factor in primary cortical neurons," *J. Neurochem.*, vol. 119, no. 6, pp. 1205–1216, Dec. 2011.

[20] "Evolution of Cell Culture Surfaces," *Sigma-Aldrich*. [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/evolution-of-cell.html>. [Accessed: 25-Aug-2014].

[21] Lee T.-Y., Chen W.-S., Huang Y.-A., Liu T.-W., Hwang E., and Tseng C.-P., "Application of aurintricarboxylic acid for the adherence of mouse P19 neurons and primary hippocampal neurons to noncoated surface in serum-free culture," *Biotechnol. Prog.*, vol. 28, no. 6, pp. 1566–1574, Dec. 2012.

[22] Brewer G. J., Torricelli J. R., Evege E. K., and Price P. J., "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination," *J. Neurosci. Res.*, vol. 35, no. 5, pp. 567–576, Aug. 1993.

[23] Bear M. F., *Neuroscience: exploring the brain*, 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

[24] Kortessmaa J., Yurchenco P., and Tryggvason K., "Recombinant Laminin-8 ( $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ ) production, purification, and interactions with integrins," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 20, pp. 14853–14859, May 2000.

[25] Ferretti J. J., Gilmore K. S., and Courvalin P., "Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2"-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities.," *J. Bacteriol.*, vol. 167, no. 2, pp. 631–638, Aug. 1986.

[26] Mohler W. A. and Blau H. M., "Membrane-bound neomycin phosphotransferase confers drug-resistance in mammalian cells: a marker for high-efficiency targeting of genes encoding secreted and cell-surface proteins," *Somat. Cell Mol. Genet.*, vol. 20, no. 3, pp. 153–162, May 1994.

[27] Promega Corporation, "CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay." Promega Corporation, Dec-2012.

[28] Trent V. P., Basarsky A., "Hippocampal Synaptogenesis in Cell Culture: Developmental Time Course of Synapse Formation, Calcium Influx, and Synaptic Protein Distribution," *J. Neurosci.*, vol. 14(11):, pp. 6402–6411, Nov. 1994.

[29] Vesa J., Krüttgen A., and Shooter E. M., "p75 Reduces TrkB Tyrosine Autophosphorylation in Response to Brain-derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 4/5," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 32, pp. 24414–24420, Aug. 2000.

[30] Riopelle R. J. and Dow K. E., "Neurite formation on laminin: effects of a galactosyltransferase on primary sensory neurons," *Brain Res.*, vol. 541, no. 2, pp. 265–272, Feb. 1991.

[31] Gitlin G., Bayer E. A., and Wilchek M., "Studies on the biotin-binding site of avidin. Lysine residues involved in the active site.," *Biochem. J.*, vol. 242, no. 3, pp. 923–926, Mar. 1987.

[32] Tinti M., Nardoza A. P., Ferrari E., Sacco F., Corallino S., Castagnoli L., and Cesareni G., "The 4G10, pY20 and p-TYR-100 antibody specificity: profiling by peptide microarrays," *New Biotechnol.*, vol. 29, no. 5, pp. 571–577, Jun. 2012.

[33] Roberts C. J., Nesta D. P., and Kim N., "Effects of temperature and osmolytes on competing degradation routes for an IgG1 antibody," *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, no. 10, pp. 3556–3566, Oct. 2013.

[34] Spens E. and Häggström L., "Protease activity in protein-free NSO myeloma cell cultures," *Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.*, vol. 41, no. 10, pp. 330–336, 2005.



[35] Elliott P., Hohmann A., and Spanos J., "Protease expression in the supernatant of Chinese hamster ovary cells grown in serum-free culture," *Biotechnol. Lett.*, vol. 25, no. 22, pp. 1949–1952, Nov. 2003.

[36] Revett T. J., Baker G. B., Jhamandas J., and Kar S., "Glutamate system, amyloid peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology," *J. Psychiatry Neurosci. JPN*, vol. 38, no. 1, pp. 6–23, Jan. 2013.

